

**Белорусский государственный университет**

**УТВЕРЖДАЮ**

Проректор по учебной работе

А.Л. Толстик

« 17 » декабря 2013 г.

Регистрационный № УД - 196 /баз.

## Селекция продуцентов

**Учебная программа учреждения высшего образования  
по учебной дисциплине для специальности:  
1-31 01 03 Микробиология**

**СОСТАВИТЕЛИ:**

Елена Аркадьевна Храмцова, доцент кафедры генетики Белорусского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент;

Наталья Павловна Максимова, заведующая кафедрой генетики биологического факультета Белорусского государственного университета, доктор биологических наук, профессор

**РЕЦЕНЗЕНТЫ:**

Кафедра биотехнологии и биоэкологии Учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет»;

Александр Петрович Ермишин, заведующий лабораторией генетики картофеля Государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», доктор биологических наук

**РЕКОМЕНДОВАНА К УТВ:**

Кафедрой генетики Белорусского государственного университета (протокол № 4 от 15 октября 2013 г.);

Научно-методическим советом Белорусского государственного университета (протокол № 2 от 25 ноября 2013 г.);

Научно-методическим советом по биологии, биохимии и микробиологии Учебно-методического объединения по естественному образованию (протокол № 19 от 29 ноября 2013 г.)

Ответственный за редакцию: Елена Аркадьевна Храмцова

Ответственный за выпуск: Елена Аркадьевна Храмцова

## ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебная программа по учебной дисциплине «Селекция продуцентов» составлена в соответствии с требованиями образовательного стандарта высшего образования первой ступени по специальности 1-31 01 03 «Микробиология».

Курс «Селекция продуцентов» раскрывает основные подходы к созданию высокоэффективных штаммов продуцентов, которые используются в биотехнологическом производстве.

Цель дисциплины – обучение студентов способам получения промышленных штаммов-продуцентов различных биологически активных соединений, а также применению полученных теоретических знаний в дальнейшей практической деятельности. Главной задачей курса является ознакомление студентов со способами генетического конструирования штаммов-продуцентов *in vivo* и *in vitro*, дать представление о подборе исходных штаммов для селекции.

В курсе рассматриваются такие важные вопросы селекции продуцентов как получение мутантов с помощью направленного мутагенеза, использование методов гибридизации и принципов отбора штаммов-продуцентов. Подробно изучаются технологии получения промышленных продуцентов аминокислот, ферментов, антибиотиков, полисахаридов, липидов, витаминов, органических кислот и других биологически активных соединений. Кроме того, программа предусматривает изучение таких вопросов как оптимизация экспрессии генов, клонированных в клетках прокариот, особенностей конструирования продуцентов на основе эукариотических микроорганизмов.

Программа курса составлена с учетом межпредметных связей и программ по смежным дисциплинам биологического профиля («Микробиология», «Генетика», «Молекулярные основы онтогенеза», «Введение в биотехнологию» и др.).

В результате изучения дисциплины обучаемый должен:

**знать:**

- принципы подбора исходного штамма микроорганизма для селекции и требования, предъявляемые к промышленным штаммам;
- получение продуцентов с помощью метода гибридизации, мутагенеза *in vivo* и направленного мутагенеза;
- конструирование продуцентов с помощью методов генетической инженерии;
- особенности конструирования продуцентов на основе эукариотических микроорганизмов;

**уметь:**

- использовать оптимальные подходы к получению продуцентов первичных и вторичных метаболитов;
- разрабатывать способы дерегуляции пути синтеза первичных и вторичных метаболитов;

- использовать подходы к созданию продуцентов с помощью методов генетической инженерии.

Программа рассчитана на 66 часов, в том числе 48 часов аудиторных: 26 – лекционных и 22 – лабораторных занятий.

### ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

№ раздел в и тем	Наименование разделов и тем	Аудиторные часы		
		Всего	Лекции	Лабо- торные занятия
I.	Введение	2	2	-
II.	Способы генетического конструирования штаммов-продуцентов <i>in vivo</i>	28	6	22
III.	Способы генетического конструирования штаммов-продуцентов <i>in vitro</i>	6	6	-
IV.	Особенности конструирования продуцентов на основе эукариотических микроорганизмов	2	2	-
V.	Оптимизация экспрессии чужеродных генов в микроорганизмах	2	2	-
VI.	Селекция продуцентов биологически активных соединений	8	8	-
<b>ИТОГО:</b>		<b>48</b>	<b>26</b>	<b>22</b>

### СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

#### I. ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы – важнейшие объекты селекции продуцентов. Цели и задачи селекции продуцентов. Основные направления развития селекции продуцентов.

Принципы подбора исходного штамма для селекции. Требования, предъявляемые к промышленным штаммам. Подготовка исходного штамма к селекции.

#### II. СПОСОБЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ *IN VIVO*

Мутагенез *in vivo*. Типы мутагенов, используемых при индуцированном

мутагенезе. Способы отбора мутантов. Методы повышения продуктивности мутантов.

Получение рекомбинантов у грибов и дрожжей методом гибридизации. Конъюгация у бактерий. Создание систем конъюгационного переноса плазмид. Трансдукция как метод создания рекомбинантных геномов. Способы сближения att-сайтов: метод делеций, метод переноса генов в различные участки, метод слияния плазмид, метод необычной посадки профага, интеграция профага через области гомологии. Трансформация бактерий фаговыми и плазмидными ДНК. Особенности трансформации у дрожжей.

Мобильные генетические элементы про- и эукариот. Характер мутаций, вызываемых мобильными генетическими элементами. Транспозонный мутагенез. Векторы, используемые для введения транспозонов.

Протопласты и сферопласты микроорганизмов. Способы получения протопластов у грамположительных, грамотрицательных бактерий, грибов и дрожжей. Метод слияния протопластов и его использование для получения рекомбинантов у бактерий, грибов и дрожжей.

### **III. СПОСОБЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ IN VITRO**

Характеристика ферментов, используемых в генной инженерии. Векторные молекулы ДНК. Определение вектора. Требования, предъявляемые к векторам. Плазмидные векторы, используемые для клонирования в клетках прокариот. Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК. Векторы на основе бактериофага  $\lambda$ . Космиды. Особенности клонирования генов с помощью космид. Фазмиды. Характеристика фазмидных векторов. Векторы на основе ДНК нитевидных фагов.

Создание геномной библиотеки. Скрининг полученной коллекции. Скрининг с помощью гибридизации, иммунологический скрининг, скрининг по активности белка. Мутагенез *in vitro*. Метод направленного мутагенеза и его модификации. Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ДНК фага M13. Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК. Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР-амплификации. Случайный мутагенез. Случайный мутагенез с использованием «вырожденных» олигонуклеотидных праймеров. Случайный мутагенез с использованием аналогов нуклеотидов.

### **IV. ОСОБЕННОСТИ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ НА ОСНОВЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Характеристика дрожжевых плазмид. Создание дрожжевых векторов типа YIp, YEр, YRp и мини-хромосом типа pYAC. Эукариотические экспрессирующие векторы. Секреция гетерологичных белков, синтезируемых *Saccharomyces cerevisiae*. Другие дрожжевые системы экспрессии. Секреция

гетерологичных белков, синтезируемых *Pichia pastoris*. Экспрессирующие векторы на основе бакуловирусов. Бакмиды. Экспрессирующие векторы для работы с клетками млекопитающих.

## **V. ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В МИКРООРГАНИЗМАХ**

Повышение экспрессии за счет эффективности транскрипции: использование сильных промоторов, использование регулируемых промоторов, мощного сайта инициации, регуляция расстояния между регуляторной областью и внедряемым геном. Регуляция эффективности трансляции: введение чужеродного гена без собственных регуляторных областей, присоединение сайта связывания рибосом, создание гибридного сайта связывания с рибосомами, добавление к концу клонированного гена терминирующего кодона, получение гибридного оперона, подавление протеолиза белков. Стабилизация белков. Метаболическая перегрузка.

## **VI. СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

Селекция продуцентов аминокислот.

Характеристика основных групп микроорганизмов-продуцентов аминокислот. Основные тенденции в развитии селекции продуцентов аминокислот. Селекция продуцентов аминокислот семейства аспарагиновой кислоты. Селекция продуцентов ароматических аминокислот. Селекция продуцентов аминокислот семейства глутаминовой кислоты. Селекция продуцентов пролина и гистидина. Селекция продуцентов ферментов.

Преимущества использования микроорганизмов для создания продуцентов ферментов. Основные тенденции в развитии селекции продуцентов ферментов. Важнейшие классы ферментов, получаемых микробиологическим способом, их основные продуценты. Способы создания продуцентов ферментов. Мировое производство ферментов, основные производители. Селекция продуцентов полисахаридов. Характеристика микробных гликанов. Использование полисахаридов, получаемых микробиологическим способом. Тенденции в развитии селекции продуцентов полисахаридов. Селекция продуцентов липидов. Характеристика микробных липидов. Основные продуценты липидов среди бактерий, грибов и дрожжей. Селекция продуцентов липидов у дрожжей. Селекция продуцентов органических кислот. Характеристика штаммов, используемых для селекции продуцентов органических кислот. Способы конструирования микробных продуцентов органических кислот. Селекция продуцентов нуклеотидов. Использование нуклеотидов и их производных, полученных микробиологическим способом. Характеристика микробных продуцентов нуклеотидов. Получение АТФ, НАД и инозиновой кислоты. Селекция продуцентов витаминов. Характеристика микробных витаминов.

Использование бактерий, грибов и дрожжей для создания продуцентов витаминов. Селекция продуцентов каротиноидов. Характеристика микробных каротиноидов. Микроорганизмы, используемые в селекции продуцентов каротиноидов. Селекция продуцентов фитогормонов. Конструирование штаммов-продуцентов гибберелинов и индолил-3-уксусной кислоты и способы повышения их продуктивности. Селекция продуцентов антибиотиков. Разнообразие антибиотических веществ, продуцируемых микроорганизмами. Антибиотики бактерий, актиномицет и мицелиальных грибов. Использование антибиотиков. Методы создания продуцентов антибиотиков и способы повышения их продуктивности.

## ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### ЛИТЕРАТУРА

#### О с н о в н а я:

1. *Глик Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М.: Мир, 2002.
2. *Щелкунов С.Н.* Основы генетической инженерии / С.Н.Щелкунов. Новосибирск. Сибирское университетское издательство, 2008.
3. *Дебабов В. Г.* Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. М.: Высш. шк., 1988.
4. *Негрук В. И.* Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы молекулярного клонирования / В. И. Негрук. М.: Агропромиздат., 1991.
5. *Егоров Н. С.* Промышленная микробиология / Н. С. Егоров. М.: Высш. шк., 1989.
6. *Хиггинс И.* Биотехнология. Принципы и применение / И. Хиггинс, Д. Бест, Дж. Джонс. М.: Мир, 1988.
7. *Елинов Н.П.* Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. СПб.: Наука, 1995.
8. *Рыбчин В.Н.* Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. СПб.: СПбГТУ, 1999.

#### Д о п о л н и т е л ь н а я:

1. *Воробьева Л. И.* Пропионовокислые бактерии / Л. И. Воробьева. М.: Изд-во МГУ, 1995.
2. *Готтшалк Г.* Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк. М.: Мир, 1982.
3. *Жданова Н.И.* Методы селекции и свойства штаммов микроорганизмов-продуцентов аминокислот / Жданова Н.И., Гусятинер М.М. Обзор. СЭНТИ. М., 1989.
4. *Дебабов В. Г.* Генетика микроорганизмов и микробиологическая промышленность. Биотехнология. / В. Г. Дебабов. М.: Наука, 1984.
5. *Воробьева Л. И.* Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. М.: Высш. шк., 1989.

6. [www.molbiol.ru](http://www.molbiol.ru) - Учебники, научные монографии, обзоры, лабораторные практикумы в свободном доступе на сайте практической молекулярной биологии.
7. [www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) и [www.swissprot.com](http://www.swissprot.com) - База данных по всем нуклеотидным последовательностям генов и первичным структурам белков в свободном доступе.

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОРГАНИЗАЦИИ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ**

Для организации самостоятельной работы студентов по учебной дисциплине следует использовать современные информационные технологии: разместить в сетевом доступе комплекс учебных и учебно-методических материалов (программа, методические указания к лабораторным занятиям, список рекомендуемой литературы и информационных ресурсов, задания в тестовой форме для самоконтроля и др.).

Эффективность самостоятельной работы студентов проверяется в ходе текущего и итогового контроля знаний.

## **ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМЫХ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ**

Типовым учебным планом специальности 1-31 01 03 «Микробиология» в качестве формы итогового контроля по учебной дисциплине рекомендован зачет.

Для текущего контроля качества усвоения знаний студентами можно использовать следующий диагностический инструментарий:

- проведение коллоквиума;
- устные опросы;
- письменные контрольные работы по отдельным темам курса;
- компьютерное тестирование;
- защита подготовленного студентом реферата.